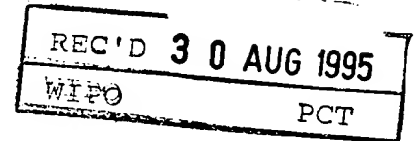


KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



PRIORITY DOCUMENT

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 10 mei 1995 onder nummer 1000332,

ten name van:

Victor SMIT

te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden en eiwitten",

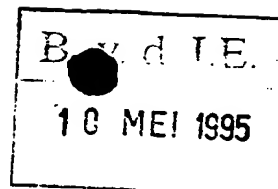
en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 17 april 1997.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

P.R.T.F. Tupan.

1000332



Uittreksel:

De onderhavige uitvinding betreft de specifieke graduele ofwel stapsgewijs
toenemende modificatie van signaal peptiden en eiwitten. Door combinatie van
5 modificatie van het peptide of eiwit met de lokalisatie daarvan met behulp van
protease behandeling en nieuwe vormen van massa spectrometrie wordt de
modificatie zeer specifiek. Zo wordt met minimale modificatie een gewenste
biologische activiteitsverandering geïntroduceerd. Behalve eenvoudige dialyse is er
geen enkele zuivering nodig, waardoor kleine hoeveelheden van het natuurlijke
10 peptide of eiwit volstaan. De werkwijze is eenvoudig, snel en maakt structurele
verificatie van het gemodificeerde eiwit of peptide praktisch uitvoerbaar. Bovendien
kan in combinatie met biologische assays een volledige structuur-functie analyse
uitgevoerd worden.

De geïntroduceerde biologische activiteitsverandering is bij voorkeur een of meer van
15 de volgende: Een verbeterde werking, een verlaagde antigeniciteit, een
antagonistische werking, een celremmende werking. De antagonistische/
celremmende werking bleek te kunnen worden geïntroduceerd door een chemische
modificatie, namelijk een alkylering, gericht op histidine residuen, gelokaliseerd in of
nabij een katalytisch Zink bindend centrum van humaan Interleukine-3. Een
20 deskundige kan met de uitvinding ook vrij gemakkelijk remmers en/of antagonisten
genereren, bij voorkeur door moleculair biologische modificaties, chemische
modificaties en/of alkyleringen, bij voorkeur met Ioodacetaat. Deze modificaties zijn
bij voorkeur gericht op His residuen, andere katalytische residuen en/of Zink
bindende residuen. Verder valt uit andere gegevens en resultaten af te leiden dat de
25 uitvinding ook gemakkelijk op andere signaalstoffen toegepast kan worden. De aldus
gebruikte methoden, verkregen stoffen en het gebruik daarvan worden dus ook
geacht bij de uitvinding te horen.

4 b

Graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden en eiwitten.

Wetenschappelijk gebied van de uitvinding:

5 Deze uitvinding is op het gebied van de chemische modificatie technologie van biologisch actieve peptiden of eiwitten. Met name wordt ingegaan op de mogelijkheden om met de chemische modificatie een beter, c.q. tegengesteld, c.q. anders werkend peptide of eiwit te krijgen. Bovendien wordt ingegaan op de mogelijkheden van structuur-functie onderzoek met behulp van graduele chemische
10 modificatie. Ook wordt er een biologisch principe beschreven, namelijk de katalytische activiteit van signaalpeptiden en de succesvolle uitschakeling daarvan die leidt tot een zeer effectieve remmer van Acute myeloïde leukemie cellen.

Als voorbeeld wordt ingegaan op de chemische modificatie van het bloed hormoon humaan Interleukine-3, dat na chemische modificatie een grote therapeutische waarde
15 heeft. Echter, iemand die kundig is op het gebied van de reeds genoemde technieken kan deze op ieder eiwit of peptide toepassen. Derhalve wordt iedere toepassing van deze technieken geacht onder het patent te vallen.

Toepassingsgebied van de uitvinding:

20 Het toepassingsgebied van de uitvinding is zeer veel omvattend, omdat alle deling, groei, differentiatie, rust, sterfte, dedifferentiatie en onderlinge afstemming van cellen gereguleerd wordt door signaalstoffen, waarvan een zeer grote en belangrijke groep die van de eiwitten en peptiden is.

25 De eerste twee voorbeelden liggen op het gebied van gemodificeerd IL-3 met een verlaagde antigeniciteit en/of versterkte werking en/of een vergrote stabiliteit. De antigeniciteit kan verlaagd worden door afscherming van de mogelijke interacties van antigene respons opwekkende aminozuren in het peptide of eiwit. De versterkte werking kan verkregen worden door bijvoorbeeld een sterkere binding aan de
30 receptor. Die zou kunnen ontstaan door afscherming van aminozuren die de receptorbinding nadelig beïnvloeden of door het aanbrengen van een lading die de receptorbinding bevordert.

Bijvoorbeeld kan met Succinic anhydride een negatieve lading in een peptide of eiwit worden aangebracht. De stabiliteit, bij voorkeur in het lichaam, kan verhoogd worden
35 alsgevolg van afscherming van mogelijke interacties van aminozuren die een aangrijpingspunt zijn voor een of meer der volgende reacties met proteasen of natuurlijk reducerende of oxiderende agentia, bij voorkeur enzymen.

Mogelijke toepassingen van dergelijk gemodificeerd IL-3 zijn:

- verkorting van de cytopenische fase na myeloablatieve therapie, zoals na de inductie therapie voor beenmergtransplantatie of na accidentele radiatie.
- inductie van een gesynchroniseerde celcyclus van cellen met een IL-3 receptor, b.v. voor chemotherapie van leukemieën.
- inductie van enhancement van de IL-3 afhankelijke celnakomelingen, zowel wat betreft aantal als wat betreft activatietoestand, voor behandeling van ziekten, b.v. worminfecties, tuberculose, schimmel-infecties, bepaalde virus-infecties.
- selectieve uitgroei van het beenmerg in de richting van kernhoudende cellen maar niet lymphocyten, b.v. bij brandwonden met non-homologe huidtransplantaten.

Mogelijke toepassingen maar niet de enige toepassingen van signaalstoffen met een antagonistische c.q. celremmende werking, met name van IL-3 zijn :

- remmingen en/of uitschakeling van myeloïde cellen bij beenmerg-transplantatie.
- myelosuppressie, bij auto-immuunziekten, bij kanker en bij ziekten van de bloedvormende organen, zoals sikkelcel bloedarmoede en thalassemie.
- op genezing gerichte behandeling van alle kankersoorten met een IL-3 receptor, met name vrijwel alle vormen van acute myeloïde leukemie of chronische myeloïde leukemie, B-cel -lymphoïde kankers of andere vormen van kanker die gestimuleerd worden door IL-3, bijvoorbeeld bepaalde follikel cel tumoren.
- inductie van tolerantie tegen eigen weefsels bij autoimmuunziekten zoals rheuma, reumatische artritis, en ziekten van het centrale zenuwstelsel door remming en/of uitschakeling van lymphoïde cellen met de IL-3 receptor. Ook kan uitschakeling van effectorcellen als de eosinofiele granulocyt geïnduceerd worden of kan de aanmaak ervan worden onderdrukt. Tenslotte is ook een directe werking op deze cellen mogelijk waarbij zelfgenezing van de eosinofilie syndromen ontstaat. Dit is ook van groot belang bij acute beelden van worminfecties en overgevoelighedsreacties, zoals voor geneesmiddelen.

- 1 - Genezing van de eosinofiele syndromen zoals eosinofiele gastritis en enteritis, fascitis, granulomatosis, sinusitis, pneumonie, asthma, Churg Strauss syndrome en andere angitisbehandelingen van het shock syndroom, bijvoorbeeld door doding of vermindering van het aantal effectorcellen.
- 5 - Ablatie of suppressie van cellen met de IL-3 receptor, met name lymfoïde cellen of effector cellen zoals de eosinofiele granulocyt voor behandeling van allergieën. Hierbij kan zowel worden gedacht aan onderdrukking van de allergie als aan inductie van tolerantie voor het allergeen.
- Behandeling tegen metastases die gestimuleerd worden door IL-3
- 10 - gemedieerde cel aanhechting.
- Behandeling van infectieziekten, bijvoorbeeld door onderdrukking van een acute fase waarbij overmatige hoeveelheden groeifactor in de bloedbaan komen.
- Behandeling van HIV-infectie en/of AIDS door onderdrukking van B-cellen
- 15 en B-cel antilichaamproductie die resulteert in bescherming van het HIV virus tegen de cellulaire afweer van de gastheer.
- Andere eventueel allergische ontstekingsreacties waarbij IL-3 een rol speelt.

20 Voor andere groeifactoren zoals de andere Interleukinen- 1 tm 8 GM-CSF, TNF en gamma IFN die volgens de uitvinding ook vrij gemakkelijk gemodificeerd kunnen worden, gelden ook een of meer van de bovengenoemde toepassingen, waarbij IL-3 vervangen kan worden door de betreffende signaalstof. Aangezien de aangrijpingspunten in de ziekten echter kunnen verschillen ligt het voor de hand dat er synergistische effecten kunnen optreden. Deze worden dan ook geacht onder de

25 uitvinding te vallen. Tenslotte vallen de volgende toepassingen nog extra toe te voegen c.q. te specificeren:

- IL-1 remming ter onderdrukking van IL-1 gestimuleerde metastases van melanoma's en longkankers
- IL-1 remming ter onderdrukking van de ziekte van Alzheimer
- 30 - IL-2 remming ter onderdrukking van capillary leak syndrome
- IL-2 remming ter onderdrukking van periodontitis
- IL-4 remming ter onderdrukking van periodontitis
- IL-4 remming ter onderdrukking van IL-4 gestimuleerde virussen zoals bijvoorbeeld het Radiation Leukemia virus bij muizen.
- 35 - IL-5 remming ter onderdrukking van IL-5 gestimuleerde luchtwegontstekingen .
- IL-6 remming ter onderdrukking van Rheumatoïde arthritis.
- IL-8 remming ter onderdrukking van AIDS en HIV infectie.
- IL-10 remming ter bestrijding van Mycobacterium infecties.

Verder wordt ook de localisatie met behulp van chemische modificatie protease
behandeling en massaspectrometrie geïllustreerd. Deze kan worden toegepast op
iedere modificatie van ieder eiwit of peptide zolang dit met een protease of op andere
wijze specifiek gefragmenteerd kan worden. In het Kwantitatieve Structuur-Functie
5 Relatie onderzoek met behulp van graduele chemische modificatie, protease
behandeling en Laser Desorptie Massa Spectrometrie is de combinatie beschreven
van de hiervoor beschreven technieken met biologische assays. De toepassing ervan
bij structuur-functie onderzoek van alle peptiden of eiwitten die modificeerbaar,
specifiek fragmenteerbaar en biologisch actief zijn valt dus ook binnen de omvang
10 van de onderhavige uitvinding.

Achtergrond van de uitvinding:

15 (humaan) Interleukine-3:

Voor Interleukine-3, een glycoproteïne geïsoleerd van T-cellen, is aangetoond dat het
op beenmerg cellen aangrijpt en deze eventueel samen met andere groeifactoren,
aanzet tot vorming van de verschillende bloedcellen. Het humane Interleukine-3(
hIL-3) is voor het eerst gecloneerd in 1987 door Dorssers et. al. met behulp van een
20 humane c-DNA bank en hybridisatie met een probe van muizen IL-3 DNA ¹.

Structuur-functie relatie van humaan Interleukine-3:

Verschillende artikelen zijn gepubliceerd betreffende het onderzoek naar de structuur-
functie relatie van humaan Interleukine-3²⁻⁶. Bij deze onderzoeken is gebruik
25 gemaakt van moleculair biologische technieken zoals de generering van deletie- en
substitutie mutanten. Hierbij is de keuze van de substitutiemutaties gebaseerd op
aminozuurhomologie met IL-3 van andere soorten (muis, rhesus aap, gibbon), of op
veranderingen in polariteit of structuur. Bij de deletiemutanten worden stukken uit het
eiwit verwijderd en zo wordt het molecuul afgescand. I.v.m. de praktische
30 moeilijkheden m.b.t. de zuivering van de mutanten zijn deze vervolgens op geen
enkele wijze gecontroleerd op grote structuurveranderingen. Dit is een groot
probleem daar het waarschijnlijk is dat deze veranderingen in veel gevallen plaats
vinden en soms zelfs beoogd worden ². Dit heeft tot gevolg dat uitspraken over
betrokkenheid van verschillende aminozuren in de biologische activiteit alleen met
35 een groot voorbehoud gedaan kunnen worden.

De onderhavige uitvinding bevat een andere benadering. Er wordt uitgegaan van natief hIL-3. Door de reactie op stapsgewijs toenemende manier uit te voeren ontstaat een activiteitsverandering. De daarbij behorende modificatie kan worden gelokaliseerd met specifieke proteases en nieuwe vormen van massaspectrometrie. Zo wordt met minimale modificatie een gewenste biologische activiteitsverandering aangebracht. Het gemodificeerde materiaal hoeft niet gezuiverd te worden en er zijn dus ook geen opbrengstproblemen. Daaruit volgt weer dat er makkelijk gecontroleerd kan worden op secundaire structuur. Deze uitvinding is dus een verbetering t.o.v. moleculair biologische technieken omdat de benadering eenvoudiger, beter te controleren en sneller uit te voeren is dan de moleculair biologische benadering.

Gemodificeerde groeifactoren:

Functionele verbeteringen:

Bij veel van de structuur-functie onderzoeken op allerlei groeifactoren zijn mutanten gevonden die een verbeterde activiteit vertoonden. Bijvoorbeeld in de Europese patentaanvraag EP-131816 wordt gestreeft naar een verhoogde biologische activiteit en minder bijwerkingen van β -Interferon. Ook voorbeelden van chemische modificaties zijn ruim voorhanden: bijvoorbeeld in de Europese patentaanvraag EP-236987 wordt IL-2 gemodificeerd waarbij een minder toxische en minder immunogene stof ontstaat die ook later geklaard wordt. Octrooiaanvraag EP-0442724 beschrijft gePEGyleerd IL-6 waarbij een product ontstaat met een langere halveringstijd en een verhoogde biologische activiteit. De octrooiaanvraag WO 88/01511 beschrijft succinylering van IL-2 waarmee een verhoogde oplosbaarheid bereikt wordt. In al deze octrooiaanvragen wordt geen modificatie-strategie gegeven behalve hoogstens een 'trial en error' benadering, waarbij gepoogd wordt om op milde wijze een of enkele modificaties op het molecuul aan te brengen. Bovendien was bijvoorbeeld bij de reeds genoemde PEG-ylering van IL-6 een zuivering nodig waarbij maar 10 % van het gewenste polypeptide overbleef. Waar de modificaties terecht kwamen werd in geen van de uitvindingen nagegaan.

Bij onderhavige werkwijze treedt vrijwel geen verlies op en kunnen de plaatsen van de modificaties wel bepaald worden. Bovendien blijkt (voorbeelden 1,4 en 5) dat het mogelijk is via graduele modificatie op specifieke wijze aminozuren op 1 specifieke plek in het molecuul te modificeren. Hoewel de meeste modificaties met irreversibele agentia gedaan worden, kunnen ook modificaties met reversibele agentia gedaan worden. Dit heeft tot gevolg dat met graduele chemische modificatie ook selectief andere residuen gemodificeerd kunnen worden.

Modificatie ter verkrijging van een antagonist of een peptide of eiwit met een gewijzigde eigenschap :

5 In het Europese patentaanvraag EP-0413383A1 wordt wel gesproken van een antagonistisch effect van een humane Interleukine-3 mutant. Het gaat hier echter om een verhouding van de nog aanwezige biologische activiteit t.o.v. de capaciteit om de binding van natief IL-3 aan de receptor te voorkomen. De absolute onderdrukking van de activiteit van de natieve groeifactor is dus niet aangetoond.

10 In de patentaanvragen PCT/US93/11197 en PCT/US93/11198 worden allerlei IL-3 mutanten geclaimd, maar ook hier is geen enkele ondersteuning van een echte remmende werking. Hier komt nog bij dat de het niet voor de hand ligt dat de mutanten met de laagste activiteiten ook de beste remmers zijn, aangezien de kans op structurele ontwrichting veel groter is dan de kans op gerichte uitschakeling van de katalytische activiteit.

15 Er zijn wel andere echte antagonisten gevonden voor receptoren van bovine groei hormoon⁷, muizen IL-2⁸, humane hepatocyt groeifactor⁹, IL-1¹⁰ en IL-4¹¹. In al deze publicaties wordt echter geen enkele modificatie strategie gegeven; het waren bijproducten van structuur-functie onderzoek. Bovendien waren er concentraties remmer nodig die gemiddeld een factor honderd boven de groeifactor concentratie zaten. Dit zijn concentraties die de klinische toepasbaarheid ernstig belemmeren.

20 De enige andere antagonist die gemaakt is met behulp van een van te voren bepaalde strategie was afgeleid van humaan groeihormoon¹². Het was gebaseerd op de ontwrichting van een van de twee receptor bindingsplaatsen van het hormoon. Ook hier nam de capaciteit voor de receptor binding met een factor 50 af, hetgeen daarom ook een bezwaarlijke overmaat van remmer ten opzichte van de groei-factor vergt.

25 Met de onderhavige uitvinding kan wel een klinisch toepasbare remming worden verkregen, mogelijk zelfs met een vergroting van de receptor bindingscapaciteit. Dit is verklaarbaar met het model dat de groeifactor na receptor binding zelf (mede) een katalytische activiteit vertoont. Dit idee werd versterkt doordat IL-3 een katalytisch Zn-ion bevat¹³. Het katalytische centrum hoeft niet in zijn geheel op de groeifactor
30 alleen te liggen. Het is heel goed mogelijk dat het centrum samen met de receptor wordt gevormd na vorming van het groeifactor receptor complex. De betreffende chemische modificatie is dan ook zo specifiek mogelijk gericht op residuen die direct of indirect betrokken zijn bij een dergelijke zink-binding en/of katalyse, en wel
35 zonder de receptorbinding aan te tasten. Het uitgangsmateriaal kan iedere peptide- of eiwit- bevattende substantie zijn. Het kan echter wel nodig zijn om het te modificeren molecuul reversibel te denatureren en chelerende agentia toe te voegen om de betreffende residuen te kunnen modificeren daar zij anders beschermd worden door de structuur van het molecuul of door gebonden metaalionen. Als illustratie maar niet

als beperking van de uitvinding wordt de modificatie van IL-3 met Joodacetaat behandeld. Bij de betreffende pH is deze gericht op alkylering van Histidine residuen. De methode kan door een deskundige echter zowel met andere reagentia gemakkelijk worden toegepast. Dit geldt ook voor andere bij katalytische activiteit en/of zink-binding betrokken aminozuren. Dit beperkt zich echter niet tot IL-3 alleen: Er is grote homologie tussen de verschillende receptoren van de cytokine superfamilie: Bij voorbeeld Interleukinen 2-7, Epo en GM-CSF. Hier kan nog aan worden toegevoegd dat bij deze uitvinding ook specifieke zink binding gevonden is voor IL-2, IL-6 GM-CSF en gamma IFN. Eveneens is het heel goed denkbaar dat de uitvinding voor veel meer signaal peptiden en/of eiwitten werkt aangezien bijvoorbeeld Insuline, humaan groei hormoon en prolactine ook een specifieke zink binding hebben. Bovendien is gevonden dat bij bepaalde IL-3 afhankelijke cellijnen, het IL-3 vervangen kon worden door onder andere Insuline. Tenslotte is het ook nog mogelijk dat alkylering van een groeifactor via andere mechanismen leidt tot antagonistische en of celremmende werking. Dus moet in zijn algemeenheid ook alkylering, bijvoorbeeld met Joodacetaat, gezien worden als een aparte benadering in de uitvinding. Derhalve worden ook al deze applicaties en gemodificeerde stoffen en het gebruik daarvan, geacht onder de uitvinding te vallen.

Voorbeelden:

Voorbeeld 1:

- Graduele chemische modificatie van IL-3 met respectievelijk Acetic anhydride en Succinic anhydride ter verkrijging van een verbeterd IL-3 met een verhoogde activiteit of een verhoogde stabiliteit.

Materialen en methoden:

Chemische modificatie:

- Acetate/NaOH werd gebruikt voor modificatie bij pH 5.0 en MES(2-N-Morpholino]ethane sulfonic acid)/NaOH voor pH 5.5, 6.0, and 6.5. Phosphate/NaOH buffer werd gebruikt voor pH 7.0. Stock oplossingen van 0.5 M werden na het maken direct met een .22 micron filter-gesterriliseerd. Het reactie mengsel bevatte 50 mM buffer, 2 mg/ml hIL-3 en respectievelijk 3 mM acetic anhydride of succinic anhydride. De 10 keer geconcentreerde stock oplossing van deze reagentia in dioxane werden voor gebruik altijd vers gemaakt. Modificatie gebeurde overnacht bij 30 °C. Na de modificatie reactie werd gecontroleerd op degradatie met SDS-electrophoresis .

Activiteitstesten:

- Biologische activiteit is bepaald als groei stimulatie van een IL-3 afhankelijke cel-lijn, de MO-7 cel-lijn(Avanzi, 1988 #33) (een gift van dr. I. Touw; Erasmus University, Rotterdam). Testen werden uitgevoerd in RPMI 1640 culture medium (GIBCO; Paisly, England), met 10 % Supplemented Bovine Calf Serum (Hyclone; Logan, Utah, USA). Na respectievelijk 6 en 10 dagen celweek van $4 \cdot 10^5$ MO-7 cellen/ml bij 37 °C and 5 % CO₂, werd de groei stimulatie getest door middel van [³H]thymidine incorporatie. De relatieve specifieke activiteit werd verkregen als het quotient van de concentratie gemodificeerd IL-3 die leidde tot een 50 % van de maximale respons en de 50 % maximale respons concentratie van de IL-3 standaard. De activiteit van de standaard op dag 6 bedroeg 1.0 miljoen units/mg eiwit (n = 10; sigma_(n-1) = 0.2 miljoen) en voor dag 10 bedroeg hij 0.2 miljoen units/mg eiwit. (n=10; sigma_(n-1) = 0.07 miljoen).

Resultaten:

- Met betrekking tot de precieze karakterisatie van de reactiemengsels met betrekking tot het gemiddelde aantal gemodificeerde groepen, de specificiteit en de plaatsen van de modificaties op het molecuul wordt verwezen naar de verderop beschreven methoden. De activiteits testen zijn gedaan als hiervoor beschreven.

De gemiddeldes en uitersten van minimaal 3 waarnemingen van de gemodificeerde interleukines zijn gebruikt in vergelijking tot het ongemodificeerde hIL-3 (Tabel 1). Uit tabel 1 volgt dat modificatie bij pH 5 met Azijnzuur anhydride op dag 6 een significante verhoging geeft in de thymidine incorporatie t.o.v. ongemodificeerd IL-3.

- 5 Bovendien blijkt dat modificatie bij pH 5 - 6 met Succinic anhydride op dag 6 en dag 10 een significante verhoging geeft in de thymidine incorporatie t.o.v. ongemodificeerd IL-3.

10 Tabel 1: Relatieve biologische activiteiten van gemodificeerd Interleukin-3

| 15 | Modificatie: | | Relatieve specifieke activiteiten: | |
|----|-------------------------------|--------|------------------------------------|-------------------|
| | | | 6 dagen-culture | 10 dagen- culture |
| | Interleukin-3 (standaard) | | 1.0 | 0.23 |
| 20 | <u>Chemische modificaties</u> | | | |
| | Acetic anhydride | | | |
| | | pH=5.0 | 1.5(1.4-2.1) | 1.4(0.83-1.5) |
| | | pH=6.0 | 0.9(0.77-0.95) | 0.9(0.70-1.1) |
| 25 | | pH=6.5 | 0.5(0.43-0.61) | 0.2(0.17-0.30) |
| | | pH=7.0 | 0.9(0.86-0.89) | 0.6(0.61-0.65) |
| | Succinic anhydride | | | |
| | | pH=5.0 | 1.7(1.6-2.0) | 1.6(1.2-2.5) |
| | | pH=6.0 | 1.4(1.2-1.8) | 1.3(1.3-1.4) |
| 30 | | pH=6.5 | 0.4(0.39-0.48) | 0.4(0.39-0.48) |
| | | pH=7.0 | 0.3(0.25-0.34) | 0.3(0.22-0.35) |

35 Voorbeeld 2:

Een methode tot graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden of eiwitten ter verkrijging van een peptide of eiwit met een tegengestelde werking .

Materialen en methoden:

- 40 Ureum, EDTA, MES, NaOH en Histidine hydrochloride, waren van Sigma. Het Na-Iodo-acetaat was van Fluka. MES/NaOH is gebruikt voor modificatie bij pH 6.0. Tien maal geconcentreerde stockoplossingen werden gemaakt en direct gesteriliseerd door middel van een 0.22 micron filter. Het reactie mengsel bevatte 50 mM buffer 2 mg/ml

humaan Interleukine-3(hIL-3) . Er was 5.5 M ureum en 50 mM EDTA nodig om voldoende modificatie te verkrijgen.

1. Zwaardere modificatie van hIL-3:

- 5 Het Joodacetaat werd toegevoegd in een concentratie 3, 10 en 30 mM.

Modificatie van 2 mg/ml humaan Interleukine-3(hIL-3) werd gedurende 24, 48 en 72 uur bij 37 °C gedaan en vervolgens werd het op natieve gel gezet. Bij 2 dagen en 30 mM Joodacetaat was er geen uitgangsmateriaal meer zichtbaar (dus minder dan 5 %). Omdat hier minimale resterende gewone biologische activiteit te verwachten was zonder ernstige
10 blijvende denaturatie van het eiwit, is met dit monster verder gegaan. Met SDS-electroforese werd vastgesteld dat het hIL-3 niet afgebroken was na de modificatie. Bij de controle werd IL-3 als boven behandeld, behalve dat er geen Joodacetaat werd toegevoegd aan de reactie-oplossing.

15 *2. Partiële modificatie van hIL-3:*

Ter optimalisering van de remmende capaciteit van het gemodificeerde hIL-3, werd er ook partiële modificatie toegepast. Modificatie van 1 mg/ml IL-3 werd gedurende 18 uur bij 37 °C gedaan met Joodacetaat in een concentratie 10, 30 en 100 mM. Na natieve electrophorese en coomassie kleuring was er bij 100 mM Joodacetaat maximale
20 modificatie van het hIL-3, zonder dat er vervaging van de banden op de gel optrad. Er was nog een zeer geringe hoeveelheid (c.a. 5 %) uitgangsmateriaal over.

3. Activiteits- en remmings-testen

De activiteits testen zijn gedaan als beschreven in voorbeeld 1. Groei respons curves
25 ($n \geq 2$) voor zowel de controle als het gealkyleerde IL-3 zijn gemaakt door tien voudige seriële verdunning van 1000 tot 1 ng/ml. Remmende activiteit van het gealkyleerde IL-3 werd getest door dezelfde titratie van controle-IL-3 maar nu in aanwezigheid van 3 ng/ml gealkyleerd IL-3.

Ter bepaling van een maximaal haalbare remmende capaciteit werd partiël gealkyleerd
30 IL-3 getitreerd in seriële zeven voudige verdunningen en in aanwezigheid van 3 ng/ml natief IL-3. De titratie-range was van 15000 ng/ml tot 0.1 ng/ml en er werden maar 4 $\cdot 10^3$ MO-7 cellen/ml gebruikt om cel sterfte door uitputting van het medium uit te sluiten.

35

Resultaten:

Uit figuur 1 blijkt dat het gemodificeerde IL-3 in staat is het controle hIL-3 met een factor 10-100 te remmen. Bovendien blijkt het gemodificeerde IL-3 in een concentratie van 3 ng/ml de gewone IL-3 bij een concentratie van 30-100 ng/ml nog voor 80 to 90 % te remmen. Het gemodificeerde IL-3 heeft dus niet alleen een remmende werking, maar

ook een verhoogde receptor binding t. o.v. controle IL-3. Dit laatste blijkt ook uit figuur 2; de titratie van partiëel gemodificeerd IL-3. Er vindt hier zelfs bij een hoeveelheid van 3ng/ml natief IL-3 een remming van bijna 50 % plaats met een concentratie van 0.1 ng/ml van partiëel gealkyleerd IL-3. Dit impliceert een betere receptor binding.

Voorbeeld 3:

Karakterisatie en localisatie van modificaties in een peptide of eiwit met behulp van protease behandeling en massaspectrometrie.

De karakterisatie beperkt zich hier tot reactie-specificiteit. Dit is gedaan door de combinatie van de resultaten van natieve elektroforese en electrospray massa spectrometrie. Doordat iedere acylering van een groep een toename geeft van de negatieve lading van het molecuul, wordt deze zichtbaar als mobiliteitstoename van het molecuul in de natieve gel na coomassie kleuring. Op deze manier kan het aantal gemodificeerde residuen op ladingsbasis gevonden worden. Met electrospray massa spectrometrie(ESMS) kan vaak ook voldoende nauwkeurigheid worden bereikt om het gemiddeld aantal modificaties via massa gerelateerde veanderingen te bepalen. Als nu blijkt dat beide bepalingen het zelfde gemiddelde aantal modificaties oplevert, dan geeft ieder modificatie van een groep ook een ladingsverandering en is de reactie dus specifiek voor amine residuen.

De lokalisatie van de modificaties kan daarna bepaald worden door specifieke protease behandelingen en laser desorptie massaspectrometrie (LDMS) dat een meer eenvoudige interpretatie van digesten toelaat dan ESMS. De nauwkeurigheid van de gebruikte LDMS bleek tot 0.1 - 0.2 % terug te brengen. Daar de aminozuurvolgorde van het hIL-3 bekend is, gaf dit ons de mogelijkheid om op eenvoudige, milde en gevoelige wijze de met specifieke proteases gegenereerde peptiden te identificeren. Endo Glu C geeft juist een onbelemmerde knip bij Asp en Glu residuen, terwijl Endo Lys C niet meer op de Lys-residuen kan knippen na acylering. Doordat bij de LDMS het signaal bij de molecuul massa's van de digesten voldoende aanwezig was, bleek het mogelijk alle modificaties te lokaliseren.

Materiaal en methoden:

Bepaling van reactiespecificiteit

Voor de werkwijze van native electroforese, zie de publicatie: Native Electrophoresis to monitor chemical modification reactions of hIL-3¹³. Bij de electrospray massa spectrometrie (ESMS) werden de IL-3 monsters uitverdund tot een eiwitconcentratie van 0.1 mg/ml in 50% V/V methanol in water met 1 % azijnzuur. Daarna werd gemeten op een TSQ- 700 triple quadrupole massa spectrometer, uitgerust met een electrospray interface.

10 Endoprotease behandeling.

Ter localisatie van de gemodificeerde residuen werd het gemodificeerde materiaal tegen de gewenste buffer gedialyseerd en geknipt met de endoproteasen Endo Glu-C of Endo Lys-C. Er werd geknipt volgens de specificaties van de fabrikant (Boehringer Mannheim, Duitsland), waarbij overnacht werd geknipt bij 37 °C, 2mg/ml hIL3 en een eiwit/protease verhouding van 30.

Laser Desorptie Massaspectrometrie(LDMS):

Voorbehandeling:

Oplossingen van 10 g/l 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB, $M_r = 154.12$) werden voor ieder experiment vers gemaakt in Mili-Q water. Zowel de eventueel gemodificeerde IL-3 oplossingen, als de digesten werden verdund tot 0.1 mg/ml. Van deze verdunde oplossingen werd 0.5 µl gemengd met 0.5 µl DHB-oplossing op de target. Vervolgens werd aan de lucht gedroogd bij kamertemperatuur in een zachte luchtstroom.

Massa spectrometrie:

25 Matrix Assisted Laser Desorptiemassa spectrometrie is gedaan op een Finnegan MAT Vision 2000 laser desorptie massa spectrometer, voorzien van een 'pulsed nitrogen laser (337 nm, pulsewidth 3 ns). Het monster werd bestraald tot juist boven de drempel tot het verkrijgen van ionen (10^6 - 10^7 W/cm²). Het acceleratie voltage was 6.5 kV. De ionen werden naversneld tot de conversie-dynode op - 10 kV voor de electronen-versterken. De standaard nauwkeurigheid is ongeveer 0.05%, maar door de experimentele condities kan deze afnemen tot 0.1-0.2 %.

Resultaten:

35 De reactie specificiteit werd bevestigd doordat de resultaten van de ESMS voldoende resolutie gaven om zelfs een volledige scheiding te krijgen van de shift van de pieken alsgevolg van de verschillende modificaties bij succinic anhydride (zie figuur 3). Bij

Acetic anhydride was er geen volledige scheiding van de massa's van verschillende aantallen modificaties. Hierbij is het gemiddelde van alle verschillende massa's bepaald. Het is gebleken dat de gemiddelde aantallen, bepaald met massa-spectrometrie, en met natieve electroforese gelijk waren. Daarom waren de modificaties specifiek voor amine residuen.

Doordat bij de LDMS het signaal ondanks hogere molecuul massa voldoende aanwezig was bleek het ook mogelijk alle modificaties te localiseren. Er zijn twee voorbeelden gegeven, een voor alleen Endo-Lys-C en een voor de combinatie van Endo Glu-C en Endo Lys C.

1- *Localisatie van de modificatie met Succinic anhydride (pH 5.0) met behulp van Endo Lys-C behandeling en LDMS.*

Bij de pH 5.0-Succinic anhydride modificatie die met Endo Lys-C geknipt werd (Figuur 4) verschoof de piek van 1085 d naar 1185 d, tevens verschoof de piek van 1108 d ($1085 + 23$ van een Na^+) naar 1208 d. Deze verschuiving heeft precies de massa van een Succinyl groep (100 d). De 1085 d piek kan op basis van de aminozuur volgorde en de protease specificiteit alleen maar worden terug gebracht tot Ala¹ - Lys¹⁰. Aangezien modificatie van Lys¹⁰ tot gevolg zou hebben dat er geen knip meer zou plaats vinden op die plek, zou er helemaal geen Ala¹ - Lys¹⁰ fragment meer zijn en dus ook geen piek bij 1185 d. Daarom is het gemodificeerde amine residu het amino-uiteinde Ala¹.

2- *Detectie van modificatie van Lys²⁸ met Acetic anhydride door middel van Endo Glu-C behandeling met LDMS en Endo Lys-C behandeling met LDMS.*

Bij de pH7.0-Acetic anhydride modificatie die met Endo Glu-C geknipt werd, schoof de piek van 1598 d naar 1640 d (figuur 5). Deze verschuiving had precies de massa van 1 Acetyl groep. Ook nu kon op basis van de aminozuurvolgorde dit stuk herleid worden tot I²³-D³⁶. Aangezien alleen Lys²⁸ zich daar bevindt, leidt dit tot de slotconclusie dat Lys²⁸ gemodificeerd is. Dit werd bevestigd bij de Endo Lys-C knip waar een fragment van 5815 d ontstond. Dit fragment is alleen verklaarbaar als Lys²⁸ het gemodificeerde residu is, zodat er niet meer na Lys²⁸ geknipt kon worden.

De andere modificaties zijn op analoge wijze geanalyseerd en het bleek dat alle modificaties gevonden konden worden. Dit resulteerde in Tabel 2 waarbij ook bleek dat bij de beide modificaties de aangrijp-punten op het eiwit hetzelfde zijn, alleen bij de Acetic anhydride modificatie is vanaf pH 5 meer gemodificeerd t.o.v. Succinic anhydride en bij pH 7.0 was ook Lys¹⁰ gedeeltelijk gemodificeerd i.t.t. bij Succinic anhydride.

Tabel 2 :Localisatie van modificaties op humaan Interleukine-3

| 5 | 10 | pH | Percentage gemodificeerde groepen voor: | |
|----|----|-----|--|---|
| | | | Acetic anhydride | Succinic anhydride |
| | | 5.0 | ala ¹ : >90 % | ala ¹ : >90% |
| 15 | | 6.0 | ala ¹ : >90 % lys 28 : ±45 % lys 66 : ±20 % lys 100: ±40 % lys 116: ±40 % | ala ¹ : >90% lys 28 : ±45 % lys 66 : ±20 % lys 100: ±25 % lys 116: ±40 % |
| 20 | | 6.5 | ala ¹ : >90 % lys 28 : ±70 % lys 66 : ±50 % lys 100: ±65 % lys 116: ±80 % | ala ¹ : >90% lys 28 : ±55 % lys 66 : ±40 % lys 100: ±50 % lys 116: ±90 % |
| 30 | | 7.0 | ala ¹ : >90 % lys 10 : ±20 % lys 28 : ±55 % lys 66 : ±35 % lys 100: ±65 % lys 116: ±40 % | ala ¹ : >90% lys 28 : ±70 % lys 66 : ±40 % lys 100: ±70 % lys 116: ±90 % |
| 35 | | | | |

Tabel 2 laat ook zien dat Lys¹¹⁶ bij pH 7 op zijn minst gedeeltelijk beschermd is. Daar bij die pH een fosfaatbuffer gebruikt is, zou het kunnen dat een fosfaatgroep op die plaats bindt en daarmee de Lys¹¹⁶ afschermt voor modificatie.

Om deze hypothese te testen is het hIL-3 gemodificeerd bij 50 mM buffer, gevormd door een mengsel van MES en fosfaat. Er is gemodificeerd met 1, 2 en 3 mM Acetic anhydride en bij pH 6.8 waar beide buffers nog goed bufferen. In aanwezigheid van 10 of meer mM fosfaat was er bescherming van Lys¹¹⁶. Bij lager of gelijk aan 1 mM fosfaat was deze bescherming afwezig. Aangezien 10 mM fosfaat de fysiologische concentratie is, volgt

uit deze waarneming dat zelfs biologisch significante fosfaatbinding met de onderhavige lokalisatiemethode kan worden waargenomen en gelokaliseerd. Derhalve is het zeer wel denkbaar om een antagonist, dan wel celgroei remmer te maken door deze fosfaatbinding te verstoren. Ook dit wordt dus geacht onder de uitvinding te vallen. Verder kan nog
5 opgemerkt worden dat de residuen Lys²⁸ en Lys⁶⁶ ook een zeer geringe bescherming door de fosfaat kregen. Dit suggereert een nabijheid in de 3D-structuur. Er wordt op deze manier dus zelfs structuurinformatie opgedaan.

Tenslotte valt nog op te merken dat de graduele chemische modificatie met minimale reactie gedaan kon worden, waarbij een specificiteit bereikt werd tot niet alleen enkele
10 types residuen, maar ook tot alleen het amine residu en zelfs tot maar 1 amine residu op het hele molecuul namelijk Ala¹. Derhalve is deze specificiteit ook in de conclusies opgenomen.

15 Voorbeeld 5:

Kwantitatieve Structuur-Functie Relatie (KSFR) onderzoek met behulp van graduele chemische modificatie, protease behandeling en Laser Desorptie Massa Spectrometrie.

KSFR-strategie

20 Dit voorbeeld is gedemonstreerd met lysine modificaties op humaan Interleukine-3. De strategie is opgebouwd uit 5 stappen waarvan de eerste stap een graduele chemische modificatie van het eiwit betreft. Hoewel de micro-omgeving van de verschillende residuen in de 3-D structuur niet bekend is, kunnen alleen al op grond van de aminozuurvolgorde verschillen worden verwacht. Meer verschillen zijn te verwachten
25 door de interacties als gevolg van de 3-D structuur. Wij hebben hierbij acylerings-reacties op hIL-3 onderzocht. Deze reacties vinden alleen plaats op ongeladen Lys-residuen, hetgeen de mogelijkheid verschaft om gradueel te modificeren door de pH van de modificatie reactie geleidelijk te verhogen.

De tweede stap is het volgen van de modificatiereactie. Om een voldoende aantal
30 mogelijkheden na te gaan ter bepaling van de meest gunstige omstandigheden is een makkelijke milde en gevoelige methode nodig. Dit is gedaan met native electroforese.

De derde stap is de bevestiging van de algemene structurele integriteit. Circulair Dichroïsme Spectroscopie kan daarvoor gebruikt worden. Hoewel kleine verschillen met deze spectroscopie niet gevonden worden, zijn grote structurele veranderingen
35 (denaturatie) zeer goed waarneembaar.

De vierde stap vormt de karakterisatie en localisatie van de gemodificeerde residuen, hiervoor zijn ESMS, natieve electroforese en digestie met specifieke proteases en LDMS gebruikt. De reactie specificiteit is bepaald door een combinatie van natieve electroforese en ESMS. Voor de localisatie zijn endoproteasen en LDMS gebruikt. De methode is
5 beschreven in voorbeeld 3.

De vijfde en laatste stap is het testen van de biologische activiteit van de verschillende gemodificeerde vormen van het eiwit. Na deze activiteitsbepaling kan de echte betrokkenheid van de betreffende gelocaliseerde residuen in de biologische activiteit
10 worden afgeleid.

Chemische modificatie, structuur bevestiging en volgen van de reactie:
Chemische modificatie van het hIL-3 en de monitoring met natieve electroforese is gedaan zoals eerder in dit patent beschreven is. In dit voorbeeld is het IL-3 gemodificeerd
15 met Acetic anhydride en met Succinic anhydride. Met behulp van Circulair dichroïsme werd gevonden dat met de Succinic anhydride modificatie boven pH 7 een algemene structuurverandering (denaturatie) plaats vond. Daarom zijn alleen de modificaties beneden of gelijk aan pH 7 nader bekeken.

20 Karakterisatie en localisatie van modificaties in een peptide of eiwit met behulp van protease behandeling en massaspectrometrie
Zie hiervoor voorbeeld 3.

25 Activiteitstesten van de verschillende gemodificeerde vormen van het eiwit en localisatie van biologisch belangrijke residuen.

De activiteitstesten zijn uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld 1, waarin ook de resultaten staan. De combinatie van deze resultaten en de resultaten van de localisatie van gemodificeerde residuen (voorbeeld 3 en Tabel 2), leidt tot uitspraken over de betrokkenheid van de verschillende residuen. Hierbij is de overgang van ongemodificeerd
30 naar pH 5.0 gemodificeerd materiaal van belang (activiteits-stijging van groter dan een factor 2) en de verschillen tussen pH 6.0 en pH 6.5 (activiteits-daling van circa een factor 2) en tussen pH 6.5 en 7.0 (activiteits-stijging: factor 2).

Daar bij de Succinic anhydride modificatie bij pH 5.0 de activiteits-stijging gepaard gaat met de modificatie van 1 groep, namelijk de Amino-terminus (Ala¹), valt te concluderen
35 dat deze groep een beperkende ofwel regulerende werking vertoont ofwel de groep is van belang voor stabiliteit van het IL-3. De activiteitstoename is ook gevonden bij structuur-

functieonderzoek met deletiemutanten ^{2, 6}, maar was toen niet herleid tot het eerste residu alleen.

5 Bij de verschillen tussen pH 6.0 en pH 6.5 is het probleem meer gecompliceerd: Voor acetic anhydride ging de met een factor 2-4 dalende activiteit gepaard met een modificatie van Lys²⁸ van 45 % naar respectievelijk 70 % van de groepen, van Lys⁶⁶ van 20 % van de groepen naar \pm 50 % van de groepen en van Lys¹⁰⁰ van 40 % naar 65 % van de groepen. Tenslotte vond een modificatie plaats van 40 % naar 80 % van Lys¹¹⁶. Dit geeft een verandering van ongemodificeerd materiaal van 60 % resterend naar 20 % resterend, een factor 3 verschil. Daar deze modificatie toename overeenkomt met de
10 activiteits afname is Lys¹¹⁶, kan de activiteits afname verklaard worden door modificatie van Lys¹¹⁶. Dit wordt verder bevestigd door de factor 3 verminderde modificatie van Lys¹¹⁶ bij pH 7. Deze vermindering van modificatie ging gepaard met een activiteitsstijging met een factor 2-3. Daarom valt te concluderen dat Lys¹¹⁶ van belang is voor biologische activiteit.

15 Dit beeld werd ook gevonden door de modificatie met succinic anhydride. Daarbij was echter geen activiteits verhoging van het bij pH7 gemodificeerde materiaal te vinden t.o.v. het bij pH 6.5 gemodificeerde materiaal. Er was echter evenmin een afname in modificatie van Lys¹¹⁶.

20 Er is gebleken dat de residuen Lys¹¹⁶ en de aminoterminus van belang zijn voor de activiteit, waarbij de aminoterminus een remmende (regulerende) of destabiliserende invloed lijkt te hebben en Lys¹¹⁶ van belang is voor de activiteit. Bovendien wordt Lys¹¹⁶ beschermd door fosfaat, hetgeen een fosfaatbinding door dat residu suggereert. Hieruit volgt dat fosfaatbinding van belang kan zijn voor de werking van het Interleukine-3. Als dit proces van belang is voor Interleukine-3 dan kan dit dus ook van
25 belang zijn bij andere peptiden en eiwitten.

Kort samengevat kunnen met deze methode biologisch belangrijke residuen gevonden worden, en bovendien is met de fosfaatbinding van hIL-3 ook een mogelijk belangrijk fysiologisch proces gevonden en gelokaliseerd. Derhalve omvat de uitvinding ook het modificeren van een peptide of eiwit ter introductie van een verbeterde of nieuwe, bij
30 voorkeur antagonistische activiteit door middel van het veranderen van fosfaat binding van het signaal peptide of eiwit. .

Conclusies:

- 1- Een methode ter lokalisering van chemisch gemodificeerde aminozuren met behulp van een specifieke protease behandeling, bij voorkeur een endoprotease behandeling, en
5 massa spectrometrie, bij voorkeur laser desorptie massaspectrometrie; deze methoden worden bij voorkeur voorafgegaan door natieve elektroforese en electrospray massa spectrometrie ter bepaling van reactie-specificiteit.
- 2- Een methode ter lokalisering van bij biologische activiteit betrokken aminozuren
10 van een peptide of eiwit, door middel van chemische modificatie, bij voorkeur op graduele wijze, in combinatie met activiteitstesten en lokalisatie van de gemodificeerde residuen, als omschreven in voorgaande conclusie.
- 3- Een methode tot chemische modificatie van humaan Interleukine-3 met als doel de
15 aanbrenging van bij voorkeur een of meer van de volgende eigenschappen: verhoogde biologische activiteit, verhoogde stabiliteit, verlaagde antigeniciteit, verkregen antagonistische activiteit of celremmende werking.
- 4- Een methode als in conclusie 3 met als kenmerk dat de modificatie graduele
20 modificatie betreft, bij voorkeur met variatie van een of meer van de volgende omstandigheden: pH, tijd, reagens- of substraat concentraties.
- 5- Een methode als conclusie 4 met als kenmerk dat de modificatie uitgevoerd wordt onder een pH die gradueel gevarieerd wordt tussen 5.0 en 7.0, bij voorkeur in stappen van
25 0.5 pH eenheden.
- 6- Een methode als conclusie 4 met als kenmerk dat de modificatie uitgevoerd wordt onder een reagens concentratie die gradueel gevarieerd wordt tussen 3 en 100 mM, bij voorkeur in stappen van een factor 3.3.
30
- 7- Een methode als een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de modificatie uitgevoerd wordt onder reactie omstandigheden waarbij de te modificeren residuen voor modificatie bereikbaarheid worden gemaakt door voldoende reversibel denaturerend agens, bij voorkeur Ureum, bij voorkeur in een concentratie van circa 5.5
35 M, en bij voorkeur voldoende chelerend agens, bij voorkeur EDTA, bij voorkeur in een

concentratie van circa 50 mM, bij voorkeur om beschermende ionen, bij voorkeur Zn-ionen te verwijderen.

- 5 8- Een methode tot modificatie van signaal-peptiden of eiwitten met als kenmerk dat de modificatie doelbewust gericht is op een of meer direct of indirect bij katalytische activiteit betrokken aminozuren, bij voorkeur Histidine residuen. De katalytische activiteit heeft als kenmerk dat hij op zijn minst gedeeltelijk afkomstig is van het signaal peptide of eiwit. De modificatie is bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch en bij voorkeur als omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 10 9- Een methode als methode 8 met als doel de aanbrenging van een antagonistische en/of celremmende werking.
- 15 10- Een methode tot modificatie van peptiden of eiwitten met als doel de aanbrenging van een antagonistische en/of celremmende werking door de fosfaatbinding van het signaal peptide of eiwit te verstoren. De modificatie is bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch en bij voorkeur als omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 20 11- Een methode tot modificatie van peptiden of eiwitten met als doel de aanbrenging van een antagonistische en/of celremmende werking door de fosfatase activiteit van het peptide of eiwit te verstoren. De modificatie is bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch en bij voorkeur als omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 25 12- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies 3 en verder, waarbij de modificatie is uitgevoerd, dan wel geoptimaliseerd is m.b.v. de methoden, omschreven in conclusies 1 en 2.
- 30 13- Humaan interleukine-3 met een verbeterde werking doordat het chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch gemodificeerd is en bij voorkeur geacyleerd en bij voorkeur met azijnzuur anhydride of succinic anhydride.
- 35 14- Chemisch gemodificeerd humaan interleukine-3 dat bij voorkeur gradueel chemisch gemodificeerd is en bij voorkeur gealkyleerd en bij voorkeur met een halo acetaat, bij voorkeur jood azijnzuur.

15- Gemodificeerd humaan Interleukine 3, bij voorkeur gemodificeerd volgens een of meer van de voorafgaande methoden met als kenmerk dat modificatie plaats vond ter plekke van alleen een of meer van de volgende residuen : Ala¹, His²⁶, Lys²⁸, Lys⁶⁶,
5 His⁹⁵, His⁹⁸, Lys¹⁰⁰ of Lys¹¹⁶.

16- Een methode van selectieve modificatie van bepaalde aminozuren op een peptide of eiwit waarbij gebruik gemaakt wordt van graduele modificatie en reversibele reagentia als in een of meer van de voorgaande methoden.

10

17- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat niet wordt uitgegaan van humaan Interleukine 3 maar van een of meer van de volgende, bij voorkeur humane, eiwitten of peptiden: andere Interleukinen, heamapoietische groeifactoren, peptidehormonen of eiwithormonen, signaalpeptiden of signaaleiwitten,
15 biologisch actieve eiwitten of peptiden.

18- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de antigeniciteit verlaagd wordt door afscherming van de mogelijke interacties van antigene respons opwekkende aminozuren in het peptide of eiwit .

20

19- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de stabiliteit verhoogd wordt als gevolg van afscherming van mogelijke interacties van aminozuren die een aangrijpingspunt zijn voor proteasen.

25 20- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de klaringstijd uit het lichaam verlengd wordt alsgevolg van afscherming van mogelijke interacties van aminozuren die een aangrijpingspunt zijn voor oxiderende enzymen of natuurlijk voorkomende oxiderende agentia.

30 21- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de receptor binding van het eiwit of peptide wordt versterkt doordat aminozuren die deze receptorbinding negatief beïnvloeden worden afgeschermd.

22- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat
35 de receptor binding van het eiwit of peptide wordt versterkt doordat een nieuwe chemische interactie in het peptide of eiwit wordt ingebouwd.

- 23- Een methode als in conclusie 22 met als kenmerk dat een lading op het molecuul wordt aangebracht, bij voorkeur een negatieve lading.
- 5 24- Een gemodificeerde signaalstof, bij voorkeur een eiwithormoon, peptide-hormoon, een groeifactor, een haemopoietische factor een interferon, een interleukine, en/of een colony stimulating factor met het kenmerk dat de modificatie zich in of nabij een compleet of gedeeltelijk katalytisch centrum bevindt.
- 10 25- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies, met het kenmerk dat de katalytische activiteit veranderd is.
- 15 26- Een gemodificeerde signaalstof, bij voorkeur een eiwithormoon, peptide-hormoon, een groeifactor, een haemopoietische factor, een interferon, een interleukine en/of een colony stimulating factor, met het kenmerk dat de modificatie zich in of nabij een metaal bindend centrum bevindt.
- 20 27- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat de modificatie zich in of nabij een zink bindend centrum bevindt.
- 25 28- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat het metaalion zich in of nabij het katalytisch centrum bevindt.
- 30 29- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat het metaalion bij de ongemodificeerde stof een katalytische functie vervult.
- 35 30- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat de binding van het metaalion veranderd is.
- 31- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat de affiniteit van de signaalstof voor de receptor minder dan een factor 10 gedaald is en bij voorkeur gelijk gebleven is of zelfs toegenomen is.
- 32- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat er een verhoogde biologische activiteit of een antagonistische en/of celremmende werking verkregen is.

- 33- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat de modificatie een moleculair biologische modificatie en/of een chemische modificatie van een aminozuur betreft. De chemische modificatie is bij voorkeur een alkylering en/of een acylering.
- 5
- 34- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat het gemodificeerde aminozuur betrokken is bij de binding van een metaal ion, bij voorkeur een Histidine.
- 10
- 35- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat het een zink bindend signaalpeptide betreft, bij voorkeur een of meer van de volgende: IL-2, IL-3, IL-6, IFN-gamma, Groei Hormoon, Prolactine en/of Insuline.
- 15
- 36- Een stof als beschreven in een of meer van de vorige conclusies met het kenmerk dat het groeifactoren betreft met receptoren uit de zelfde (cytokine-) superfamilie als de IL-3 receptor, bij voorkeur IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, GM-CSF en/of Epo.
- 20
- 37- Ieder preparaat bevattende een stof, zowel in de vorm van een mengsel of verbinding, zoals omschreven in een of meer van de vorige conclusies en/of zoals gemaakt met een methode zoals omschreven in een of meer van de vorige conclusies.
- 25
- 38- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 30
- 39- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de remming van vormen van kanker, bijvoorkeur leukemieën zoals AML, CML, en vormen van B-cel- lymfoïde leukemieën.
- 35
- 40- Het gebruik van ieder preparaat met antagonistische en/of celremmende werking, zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de remming van vormen van kanker die door de ongemodificeerde groeifactoren gestimuleerd of geremd kunnen worden; bijvoorbeeld leukemien of follikel cell tumoren.

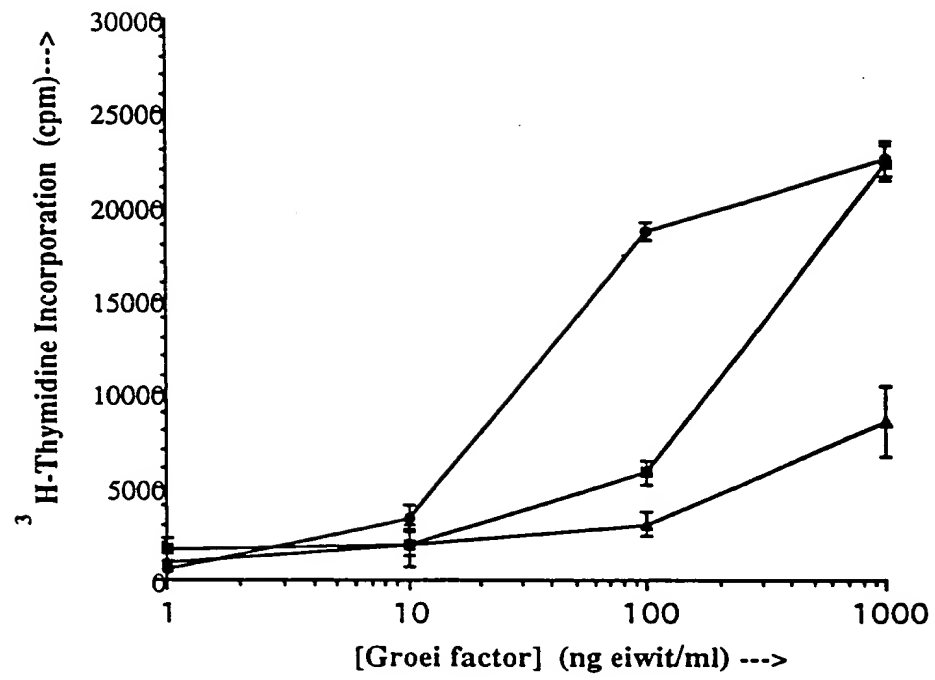
- 41- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de onderdrukking van ongewenste afweerreacties in het immuunsysteem.
- 5 42- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de onderdrukking van vormen van allergische reacties, acute hypersensitieve reacties, ontstekingen, urticaria, asthma, arthritis en auto-immuun ziekten .
- 10 43- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de onderdrukking van ongewenste afweerreacties in het immuunsysteem door de onderdrukking van histamine-productie en histamine producerende cellen.
- 15 44- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de onderdrukking van ongewenste afweerreacties in het immuunsysteem door de onderdrukking van monocyt aanhechting aan endotheel cellen.
- 20 45- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de onderdrukking van virale infecties, bij voorkeur door suppressie van geïnfecteerde en mogelijk geactiveerde gastheercellen.
- 25 46- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de onderdrukking van ziekten die ontstaan als gevolg van een overmatige productie van bepaalde bloedcellen zoals sikkelcel bloedarmoede en de thallassemie.
- 30 47- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de myeloablatie voor beenmergtransplantatie.
- 35 48- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de inductie van tolerantie tegen eigen weefsels bij autoimmuunziekten, door suppressie van cellen met de IL-3 receptor, bij voorkeur de onderdrukking van lymfoïde cellen.

- 49- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de genezing van de eosinofilie syndromen, zoals eosinofiele gastritis en enteritis, fascitis, granulomatosis, pneumonie, Churg Strauss syndrome en andere angitisbehandelingen van het shock syndroom, door uitschakeling of suppressie van het aantal effectorcellen.
- 5
- 50- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies met als extra doel de remming, onderdrukking en/of genezing van een HIV-infectie door suppressie van antilichaam- productie door B-cellen en/of de suppressie van vorming en/of uitrijping van B-cellen.
- 10
- 51- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies, met als extra doel de stimulatie van stamcel-replicatie.
- 15
- 52- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies samen met gebruik van andere signaal peptiden of eiwitten..
- 20
- 53- Iedere methode die leidt tot een gemodificeerde signaalstof als genoemd in een of meer van de voorgaande conclusies
- 54- Ieder nog niet in de conclusies genoemd gebruik zoals omschreven in het toepassingsgebied van de uitvinding.
- 25
- 53- Iedere denkbare combinatie van twee of meer van de voorafgaande conclusies, al dan niet leidend tot synergistische effectiviteit.

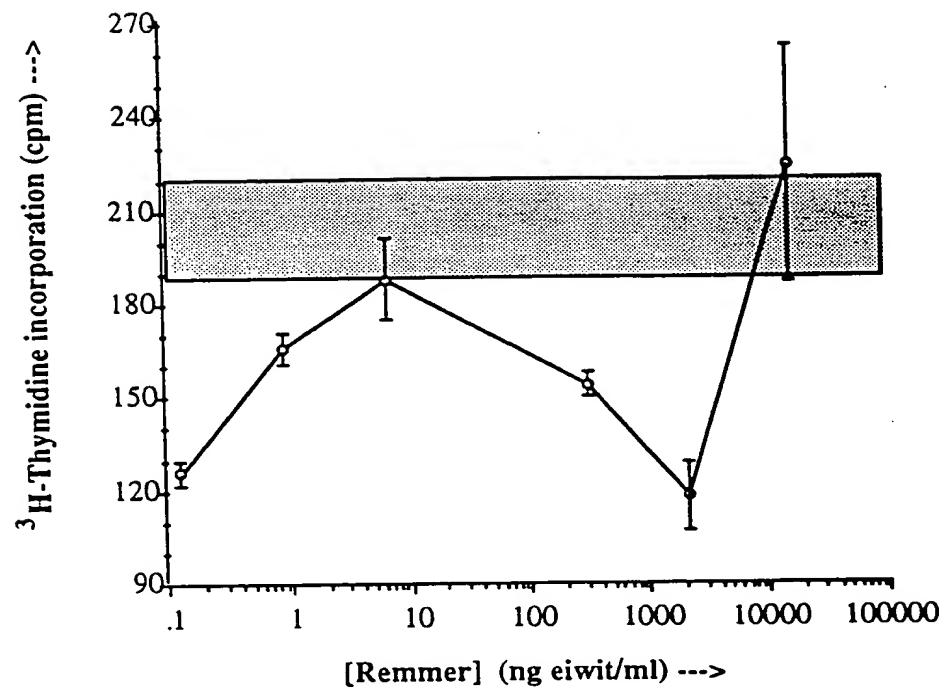
Literatuur:

1. Dorssers, L.C., *et al. Gene* **55**, 115-124 (1987).
- 5 2. Dorssers, L.C., *et al. J Biol Chem* **266**, 21310-21317 (1991).
3. Kaushansky, K., *et al. J Clin Invest* **90**, 1879-88 (1992).
4. Lokker, N.A., *et al. J Immunol* **146**, 893-8 (1991).
5. Lokker, N.A., Zenke, G., Strittmatter, U., Fagg, B. & Movva, N.R. *Embo J* **10**, 2125-31 (1991).
- 10 6. Lopez, A.F., *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11842-6 (1992).
7. Okada, S., *et al. Endocrinology* **130**, 2284-90 (1992).
8. Zurawski, S.M. & Zurawski, G. *EMBO J.* **11**, 3905 (1992).
9. Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K. & Kitamura, N. *Biochemistry* **31**, 9555-61 (1992).
- 15 10. Conti, P., *et al. Scand J Immunol* **36**, 27-33 (1992).
11. Aversa, G., *et al. J Exp Med* **178**, 2213-8 (1993).
12. Fuh, G., *et al. Science* **256**, 1677-80 (1992).
13. Smit, V., van Veelen, P.A., Tjaden, U.R., van der Greef, J. & Haaijman, J.J. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 859-66 (1992).
- 20 14. Avanzi, G.C., *et al. Br J Haematol* **69**, 359-66 (1988).
15. Claassen, E., Kors, N. & Van, R.N. *Eur J Immunol* **16**, 271-6 (1986).
16. Benen, J., *et al. Eur J Biochem* **202**, 863-72 (1991).
17. Provencher, S.W. & Glockner, J. *Biochemistry* **20**, 33-37 (1981).

Figuur 1

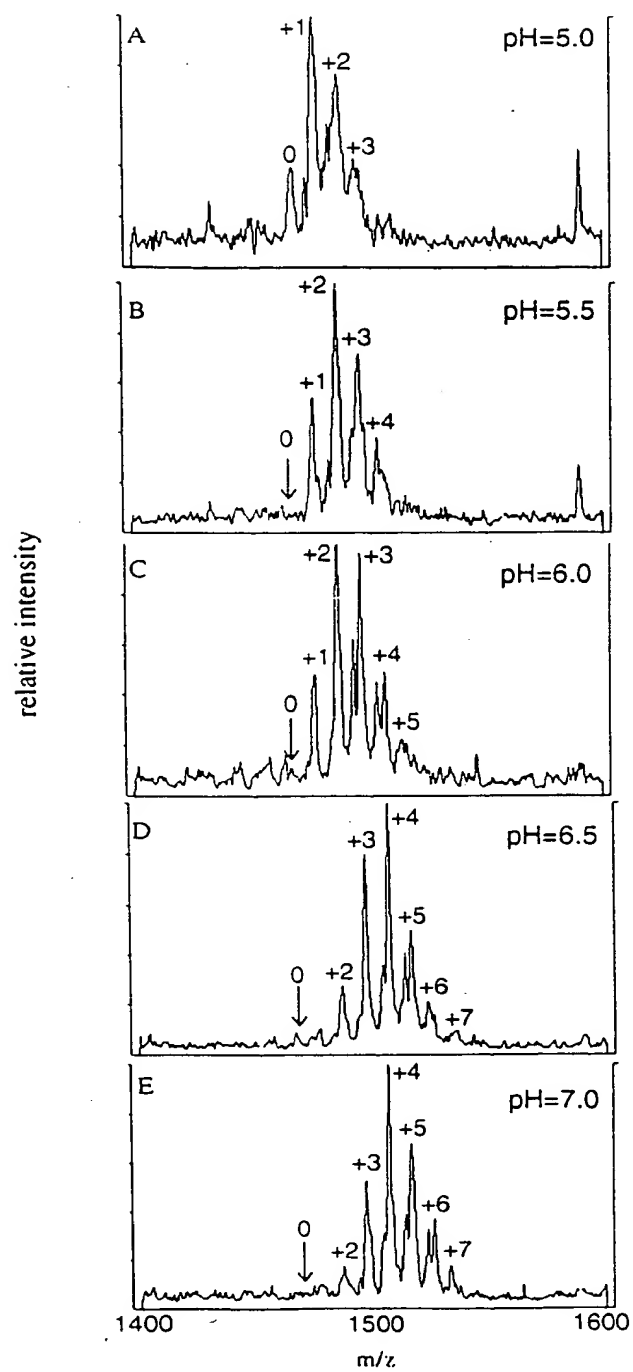


Figuur 2

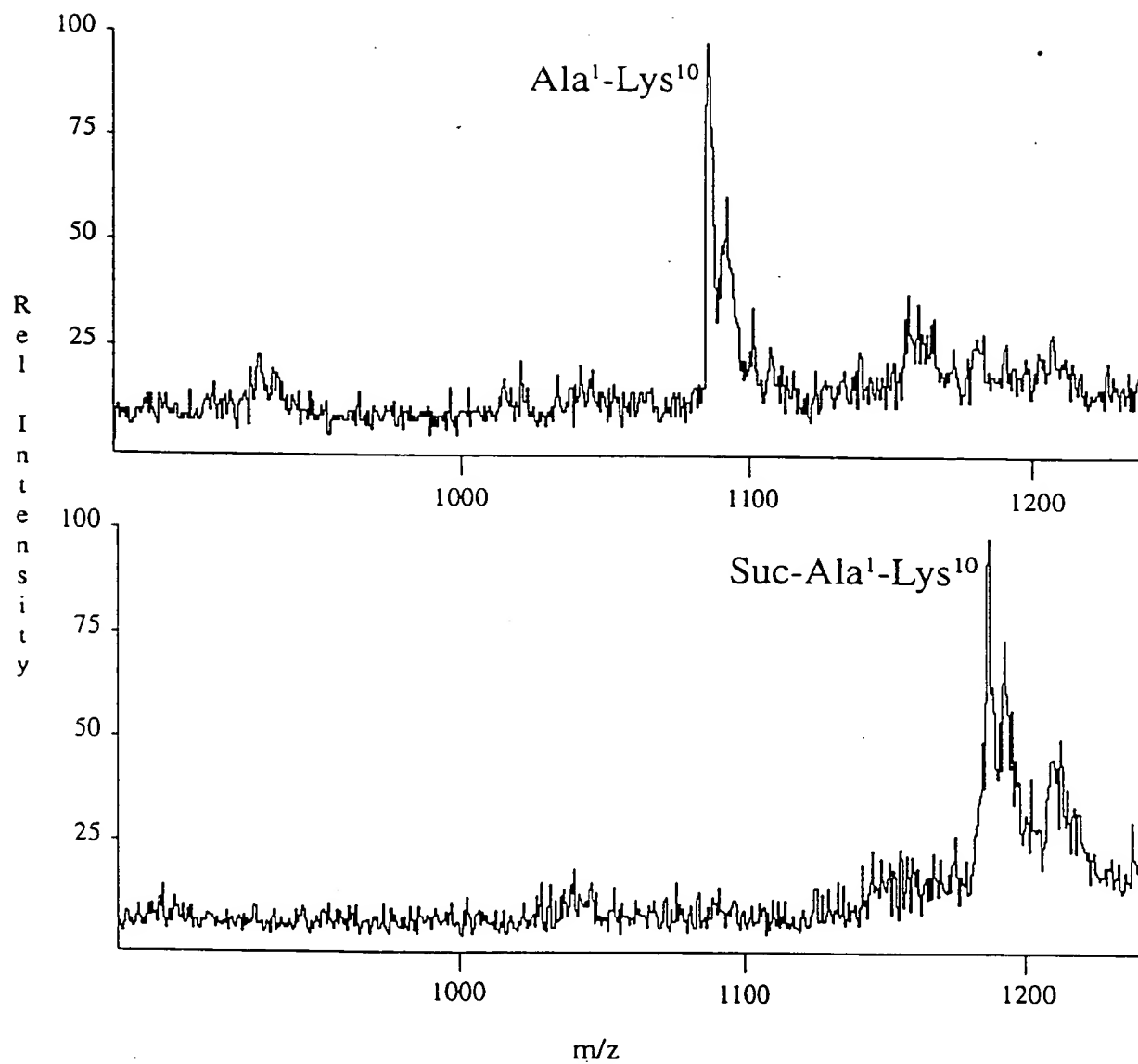


1000332

Figuur 3

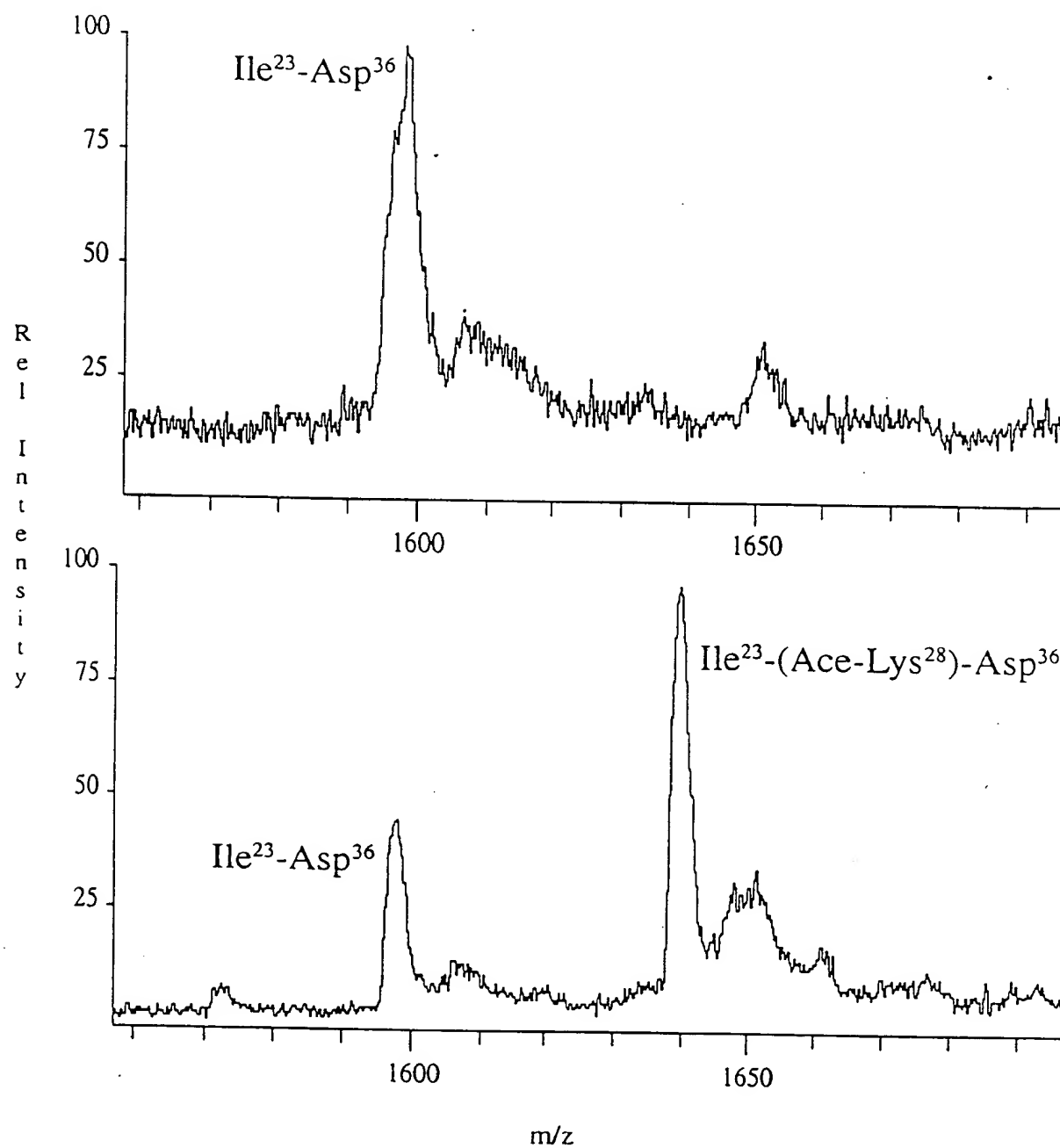


Figuur 4



1000332

Figuur 5



11 Ile